



TITLE:

Spatiotemporal Patterns Produced by Bacterial Species *Proteus mirabilis* (Mathematical Aspects of Complex Fluids II)

AUTHOR(S):

渡辺, 一彦; 脇田, 順一; 伊藤, 裕人; 松山, 東平; 松下, 貢

CITATION:

渡辺, 一彦 ...[et al]. Spatiotemporal Patterns Produced by Bacterial Species *Proteus mirabilis* (Mathematical Aspects of Complex Fluids II). 数理解析研究所講究録 2001, 1184: 89-105

ISSUE DATE:

2001-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/64611>

RIGHT:

Spatiotemporal Patterns Produced by Bacterial Species *Proteus mirabilis*

渡辺 一彦 (Kazuhiko Watanabe), 脇田 順一 (Jun-ichi Wakita), 伊藤 裕人 (Hiroto Itoh)
松山 東平¹ (Tohey Matsuyama), 松下 貢 (Mitsugu Matsushita)

中央大学大学院理工学研究科

(Department of Physics, Chuo University, Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8551)

¹新潟大学医学部細菌学教室

(Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine, Niigata 951-8510)

我々は、同心円状コロニーを形成することで有名な *Proteus mirabilis* が比較的栄養が豊富で、寒天濃度が低い寒天培地上で形成する時空パターン形成機構について研究してきた。このパターンは時間的、空間的に変化し、特徴的なパターンとしてストライプパターンや湧き出し、吸い込みの見られるターゲットパターン、回転するスパイラルパターンが観察される。これらの特徴的なパターンは BZ 反応や液晶対流系などの無機系に見られることが知られている。我々は *P. mirabilis* が形成する時空パターン形成機構がモアレ像ではないかという仮説に基づいてマクロ、ミクロの両面から検証実験を行ってきた。その結果、現象論的に時空パターンをモアレ像として理解する事を支持する結果が得られた。

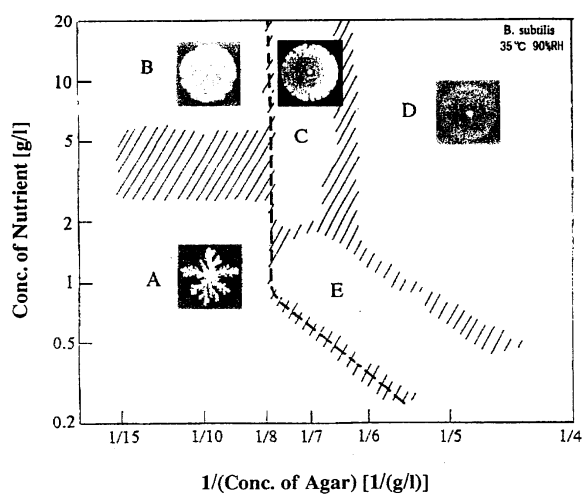
§ 1. Introduction

一般に、生物系に見られるパターンのダイナミクスは生物固有の因子の為に無機系に見られるパターンのそれに比べて複雑であると考えられる。しかし、生物を集団として捉え、「生物=増殖+運動」と考えることにする。バクテリアを試料とする際、この増殖と運動に対応するパラメーターとしてそれぞれ増殖 \leftrightarrow 栄養濃度、運動 \leftrightarrow 寒天濃度とする。栄養濃度、寒天濃度をパラメーターとした場合、*Busilus (B.) subtilis* について図 1 のような morphological diagram が得られている[1]。バクテリアの作るコロニーパターンであるにも関わらず、DLA-like、DBM-like、Eden、同心円状、Disk 状の無機系でも見られるパターンが見られ、バクテリアコロニーの形成機構はある極限では物理的要因によって支配されていると考えられる[2]。また、パターンの構成要素であるバクテリアは、試料として以下のような利点を備えている。

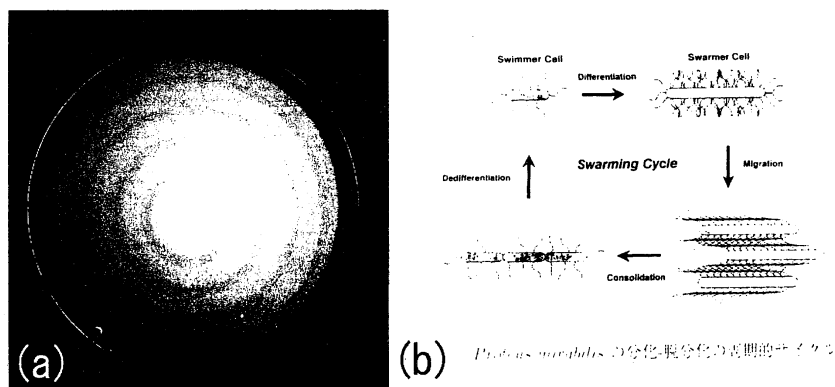
- I 分裂、増殖を繰り返す比較的単純な単細胞生物である。
- II 細菌学的に諸性質が知られている。
- III マクロなコロニー観察から、顕微鏡を用いたミクロな観察まで様々なスケールでの観察が容易である。

以上の事から、バクテリアコロニーの形成機構を研究する事は、系によらずパターン形成機構一般についての理解の一助となると考えられるという発想のもと、バクテリアコロニーの形成機構の研究を行っている。

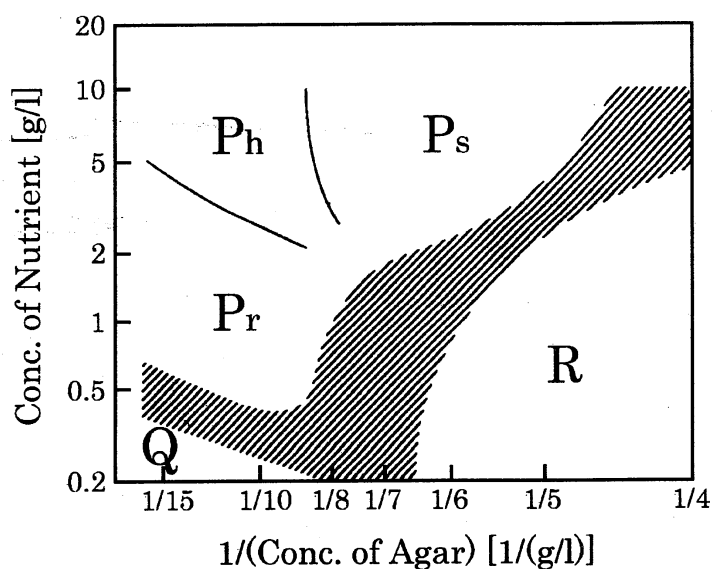
今回、我々が試料として用いた菌は *Proteus (P.) mirabilis* (NPC3007) で、ほぼ完璧な同心円状コロニー (図 2-a) を作る事で古くから知られ、物理的、細菌学的にもその集団的振るまいの結果形成される同心円状コロニーの研究が行われている[3,4,5,6]。*P. mirabilis* は鞭毛を持つ棒状のバクテリアで、環境に応じて分化、脱分化を繰り返し 2 種類の細胞形態を取る (図 2-b)。一つは、swimmer cell と呼ばれ、 $1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$ 程度の長さを持つ短い細胞で、4~10本の鞭毛を持ち、運動性には優れていない。もう一つは、swarmer cell と呼ばれ、 $10 \sim 80 \mu\text{m}$ 程度の長さを持つ長い細胞で、 $10^3 \sim 10^4$ 本程度の鞭毛をもち運動性に優れている。この *P. mirabilis* を *B. subtilis* と同様に栄養濃度、寒天濃度をパラメーターとして寒天培地上で培養すると、図 3 のような morphological diagram が得られている[7]。



(図 1) Morphological diagram of bacterial colonies by *B. subtilis*. (M. Ohgiwari et.al)

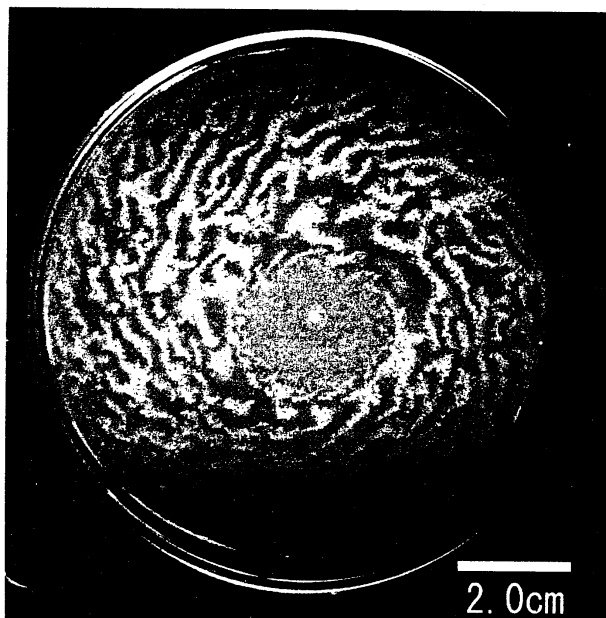


(図 2) (a)*P. mirabilis* の同心円状リングコロニー(寒天濃度 2.2%、栄養濃度 1.5%)
(b)2 つの細胞形態(swimmer cell、swarmer cell)とその分化脱分化のサイクル。



(図 3) Morphological diagram of bacterial colonies by *P. mirabilis*. (A. Nakahara et.al)
縦軸は栄養濃度 C_n 、横軸は寒天濃度 C_a の逆数 $1/C_a$ 。縦軸の上方ほど栄養豊富で細菌の増殖が活発に行われ、横軸の左に行くほど寒天が硬く、菌の運動が妨げられる。

P. mirabilis のコロニーパターンは大きく P、Q、R の 3 種類に分ける事が出来る。P は周期的な拡大を基本とし、Q は DLA-like なパターン、R は三次元的な成長をする。P 領域はさらに Pr、Ph、Ps の 3 つの領域に分ける事が出来、それぞれ Pr は同心円状リングコロニー、Ph は homogeneous なコロニー、Ps は時間的空間的に変化する雲のようなパターンである [7,8]。Ps 領域に見られるパターン (図 4) を時空パターンと呼んでおり、本稿では、この時空パターンの形成機構について述べていく。



(図 4) *P. mirabilis* (NPC3007) が形成する時空パターン。菌接種から約 10 時間後に撮影。
寒天濃度 $Ca=0.6\%$ 、栄養濃度 $Cn=1.5\%$ 。

時空パターンはシャーレ上にコロニーが拡大した後に 3 時間程度現れ、特徴的なパターンとしてストライプや欠陥のあるストライプ、湧き出しと吸い込みの両方が見られるターゲットや回転するスパイラルを含む時間的、空間的に変化する動的なパターンである。Pr 領域に見られる同心円状コロニーや Ph 領域に見られる homogeneous、Q 領域に見られる DLA-like、R 領域に見られる三次元的なパターンはその最終的なコロニーパターンであるのに対して、時空パターンはある一定時間内にのみ観察される過渡的なパターンである。時空パターンが現れてから見られなくなるまでの一連の過程は次のようになる。寒天培地上に菌液を植え付けてから増殖に要する約 3 時間程度の lag-phase time の後、migration を開始し約 5 時間かけてディスク状に拡大していく。コロニーが直径 8.8cm のシャーレ全体に拡大した後、約 30 分程度するとシャーレのある場所から時空パターンが現れはじめ、シャーレ全体に広がっていき、3 時間ほど継続した後終了する。時空パターンが現れてから終了するまでの一連の様子が図 5 に示してある。この時空パターンは、時間的空間的に変化するパターンであるが、パターン変化は非常にゆっくりで、肉眼で観察する限りではパターン変化は認められず、静止して見える準静的パターンである。その特徴的時間は 60 秒~90 秒程度である。また、パターンの特徴的長さは~mm のオーダーである。このように、マクロに見ると準静的で~mm のオーダーを持つパターンから構成される時空パターンも、ミクロに見ると~ μm の *P. mirabilis* が集団運動をしている様子が観察される。~ μm の菌の集団運動の結果、マクロに~mm の時空パターンを形成することは非常に興味深い現象である。



(図 5) 時空パターンが起こり始めてから、終わるまでの様子。①はパターンが現れはじめたところで、②、③、④の順に広がって行き、やがて⑤、⑥のように終了していく。①～④を時空パターンと呼び、③、④の時に特徴的パターンとしてストライプ、ターゲット、回転するスパイラル等が見られる。

ストライプやターゲット、スパイラルなどのパターンは、液晶対流系や BZ 反応など他の系でも観察され、パターン形成の分野において興味深く、様々な研究がなされている [9,10,11]。このようなパターンを特徴的パターンとして含む時空パターンの形成機構及び現象をどのように理解したら良いのかという疑問のもと、我々は一つの仮説をもうけ、形成機構と現象の理解を試みた。我々は、時空パターンの実体がモアレ像ではないかという仮説をたて、マクロ、ミクロの両面から検証していった。モアレ像とは、繰り返しパターンの重ね合わせによって、新たに明暗の繰り返しパターンが生じる現象で、日常あらゆるところで容易に見られる現象である。例えば、レースカーテンを 2 枚重ねるだけで現れる。画像処理の分野においては、むしろこのモアレ効果を如何に取り除くかが問題になっている [12]。そして、重ね合わせ構造の微妙な変化に対して、敏感に変化するという特徴がある。この仮説を検証するために、マクロ、ミクロにそれぞれ以下の事柄を確認した。

<マクロ>

- ①時空パターンに見られるパターンがモアレ像にも見られるのか？
- ②時空パターンは光学的パターンなのかどうか？
- ③重ね合わせ構造の変化に対する敏感性がみられるか？
- ④パターンに見られる明暗は菌密度の高低の反映なのか？

<ミクロ>

時空パターンをミクロに観察した時、モアレ像が生じるのに必要な層構造が存在するのか？

§ 2. Experimental Procedures

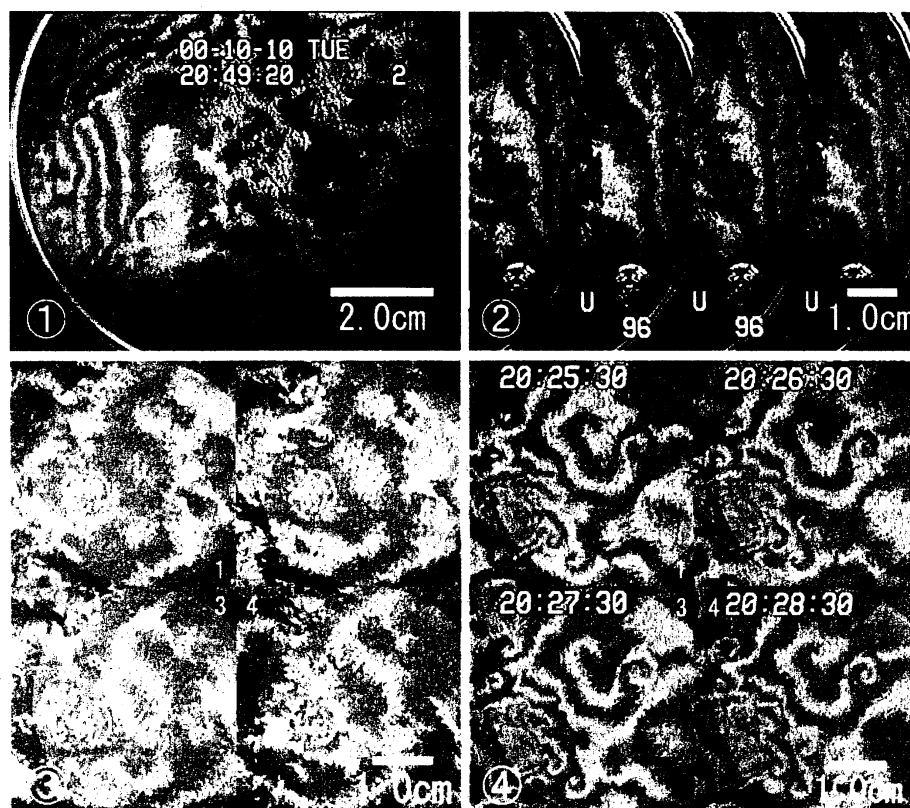
本実験では試料バクテリアとして、*Proteus (P) mirabilis* (NPC3007) を用いた。また、*P. mirabilis* の実験方法は以下になる。11 当たり 10g (1.0%) の NaCl を含む純水に、栄養分となる Bacto Pepton (Difco, Detroit)、菌の運動性に影響する寒天 Agar (Eiken, Japan) を加え溶解させた後、1N の水酸化ナトリウム (NaOH) を加えて pH=7.1 に調節する。次にオートクレーブで 121℃、15 分滅菌する。その後、内径 88 mm のシャーレに 20 ml 注ぎ込み、4℃で 10 分冷蔵し、その後 55℃、60 分乾燥させる。以上の様にして作られた寒天培地上に OD(optical density)=0.5(wavelength 600 nm)の菌液を 3 μ l 点接種し、37℃で培養する。この時、パラメーターとして寒天濃度 *Ca* と栄養濃度 *Cn* を変化させることによって観察

したいコロニーを再現する。特に、本研究において時空パターンを再現する際の寒天濃度、栄養濃度はそれぞれ $Ca=0.6\%$ 、 $Cn=1.5\%$ とした。再現されたコロニーパターンのマクロな観察では、パターンの静止画の撮影にはデジタルカメラ C1400L (Olympus, Tokyo) を用い、パターンの時間的空間的变化の記録には CCD カメラ CS572S (Sankei, Tokyo)、MC-780P (Texas Instruments, USA) を通して撮影した映像をタイムラプスビデオ SVT-S5100 (SONY, Tokyo) を用いてビデオテープ上に記録した。一方、ミクロな観察では、顕微鏡 DIAPHOT-TMD (Nikon, Tokyo) を通してビデオテープに記録した。

§ 3. Experimental Results of Macroscopic Features

3. 1. 時空パターンに特徴的なパターンがモアレ像にも見られるか？

時空パターンには、特徴的なパターンとして図 6 のようなストライプ、欠陥のあるストライプ、湧き出しや吸い込みのあるターゲット、回転するスパイラルなどが観察される。タイムラプスビデオを用いて各パターンが変化する様子を記録した映像から、各パターンについて次の事が確認された。ストライプは、ストライプに垂直な方向に移動しながら明暗が逆転し、欠陥のあるストライプでは、ストライプが移動しながら欠陥部分においてストライプのつなぎ換えが起こる。ターゲットは不動点を中心に周期的に湧き出す場合、吸い込む場合の 2 通り観察される。また、その周期は \sim 分のオーダーである。同様に回転するスパイラルも不動点を中心に回転しながら周期的に湧き出す場合、吸い込む場合の 2 通り観察され、その周期も \sim 分のオーダーである。興味深い事に回転するスパイラルでは左巻きしか観測されず、対称性が破れている。

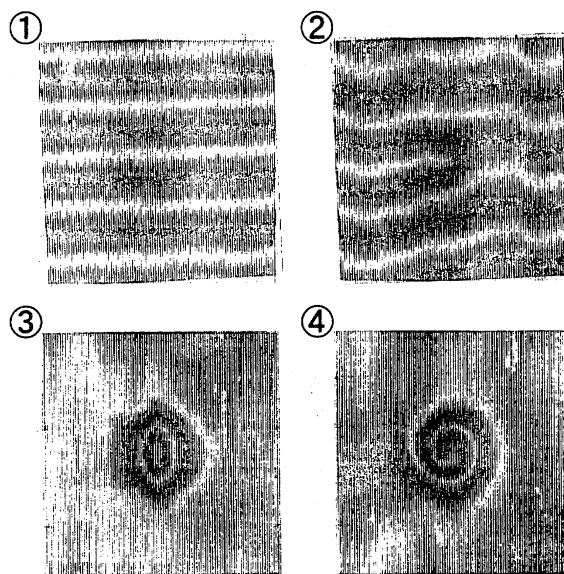


(図 6) 時空パターン中に見られる特徴的なパターン。①ストライプ ②欠陥のあるストライプ (60 秒間隔で撮影) ③湧き出すストライプ (20 分間隔で撮影) ④回転するスパイラル (60 秒間隔で撮影)

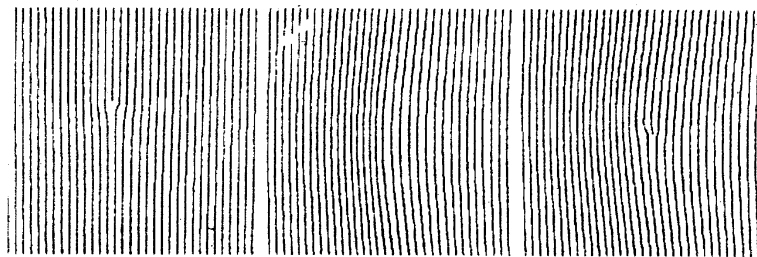
これらの時空パターンがモアレ像にも見られるのかを確認するために、モアレ効果を用い

たモデルとの比較を行った。スパイラルとターゲットを、モアレ効果を用いて再現できる事を提案するこのモデルによれば、standard、dislocation、Gaussian hill、Gaussian hill with dislocation layer の各層を①～④の組み合わせに従って重ね合わせることで図 7-(a)の各パターンが得られる[13]。ここで、standard layer は、等間隔に 100 本の垂直線をひいた層とする。dislocation、Gaussian hill、Gaussian hill with dislocation layer はそれぞれ standard layer の中心に図 7-(b)のような、欠陥、ガウス分布の丘、欠陥のあるガウス分布の丘をつけた層とする。

- ①standard + standard → stripe pattern
- ②standard + dislocation → stripe pattern with dislocation
- ③standard + Gaussian hill → target pattern
- ④standard + Gaussian hill with dislocation → spiral pattern



(図 7-a) モアレ効果を用いた単純なモデルによって再現される各パターン。
①ストライプ ②欠陥のあるストライプ ③ターゲット ④スパイラル



(図 7-b) 左から dislocation、Gaussian hill、Gaussian hill with dislocation

①の組み合わせにおいて、モアレ効果によって現れたストライプは、2 つの層を互いにずらす事によって明暗が移動する。また、2 枚の standard layer を重ねる際、各層に描かれた垂直線がなす角度が 0 度に近いほど、太いストライプが見られ、なす角度が大きくなるに従ってストライプは細くなる。②の組み合わせでは、dislocation layer に存在する欠陥がモアレ像にも反映するため、欠陥のあるストライプが見られる。2 つの層を互いにずらすと、同様に明暗が移動するが、①と比べて興味深いのは、欠陥部分においてストライプのつながり換えが見られることである。③の組み合わせでは、Gaussian hill の存在の為に、モアレ像とし

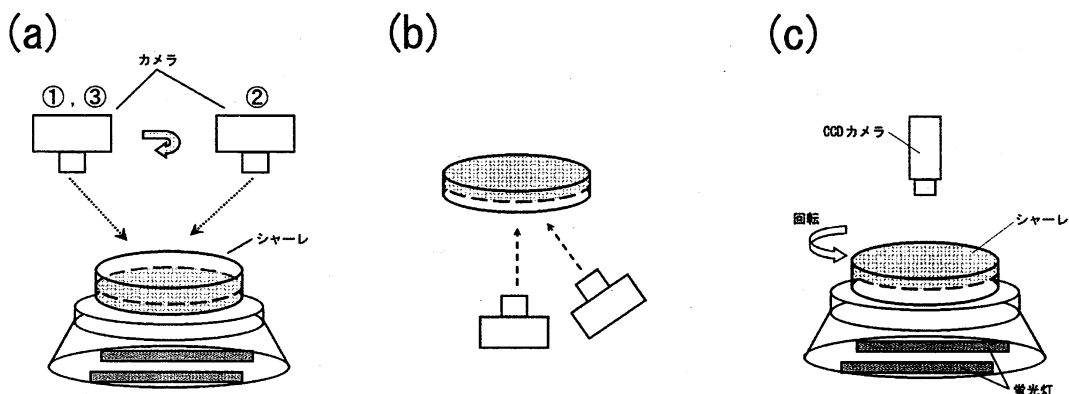
てターゲットが見られる。この時、standard に対して Gaussian hill を、Gaussian hill の膨らんでいる方向に平行移動させると湧き出すターゲットが見られ、Gaussian hill を中心として明暗のリングが外側に向かって伝播していく。一方、逆に standard に対して Gaussian hill を、Gaussian hill の膨らんでいる方向とは逆方向に平行移動させると吸い込むターゲットが見られ、ターゲットの中心に向かって明暗のリングが吸い込まれていく様子が見られる。④の組み合わせでは、Gaussian hill with dislocation を中心としたスパイラルが見られる。standard に対して Gaussian hill with dislocation を、Gaussian hill の膨らんでいる方向に平行移動させると、回転しながら湧き出していくスパイラルが見られる。一方逆に、standard に対して Gaussian hill を、Gaussian hill の膨らんでいる方向とは逆方向に平行移動させると、回転しながら欠陥に吸い込まれていくスパイラルが見られる。

以上、モアレ効果を取り入れた単純なモデルによって、時空パターンに特徴的なパターンが再現される事が確認できた。

3. 2. 重ね合わせ構造の変化に対する敏感性

次に、重ね合わせ構造の変化に敏感であるというモアレ像の特徴が時空パターンにおいても見られるかどうかを確認した。周期構造を持つ 2 枚のシートを密着させて重ねた場合、互いにシートをずらす事によって重ね合わせ構造を変化させると、モアレ像は敏感に変化する。例えばターゲットやスパイラルであれば湧き出しや吸い込みが起き、欠陥のあるストライプではストライプの切り替えが見られる。一方、周期構造を持つ 2 枚のシートを密着させるのではなく、少し隙間を空けて重ねた場合、シートをずらさなくても見る角度を変えるだけで重ね合わせ構造が変化してモアレ像は敏感に変化し、同様に湧き出し、吸い込み、切り替え等が見られる。

このような重ね合わせ構造の変化に対する敏感性は肉眼による時空パターンの観察から明らかで、時空パターンが現れている時にパターンを見る角度を変えたり、光をあてる角度を変えると、パターンは瞬時に変化する。そこで、この敏感性の証拠を示す以下の 3 つの方法とその結果を合わせて示す。



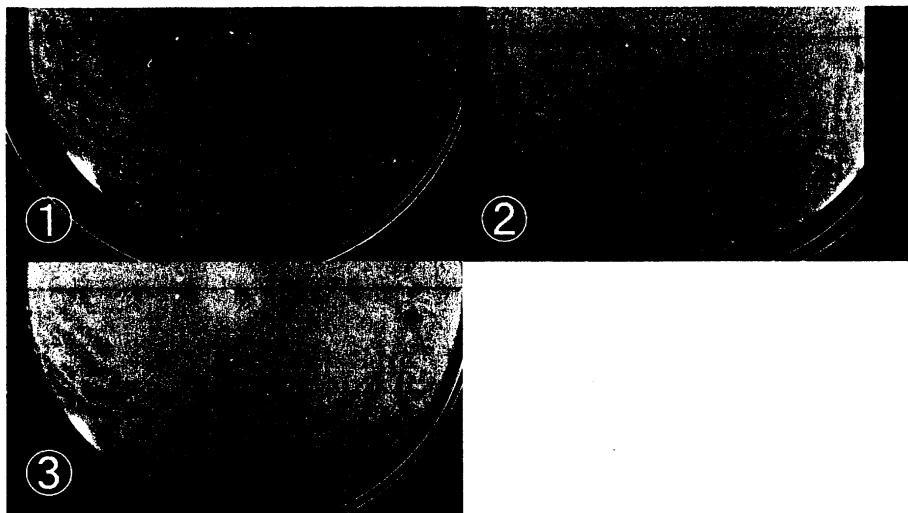
(図 8) (a)シャーレ上のパターンを、角度を変えて 2 箇所から撮影。まず左①で撮影し、次に右②で撮影した後再び左③で撮影する。①と③は同位置。(b)シャーレ上のパターンを、角度を変えて 2 箇所から同時に撮影。(c) 平行に並べた 2 本の蛍光灯によってシャーレ上のパターンを照らし、シャーレを $0\pi \sim 2\pi$ まで回転させる事によって光のあて方を変化させ、パターンが変化する様子を上方から CCD カメラで記録する。

(その 1) 図 8(a)のように、シャーレ上のパターンを、角度を変えて 2 箇所の位置から撮影した。まず左①から撮影し、その後右②から撮影した後再び元の左の位置③から撮影した。その結果、図 9(a)において①と②を比較すると、パターンの明暗が反転している。また、カ

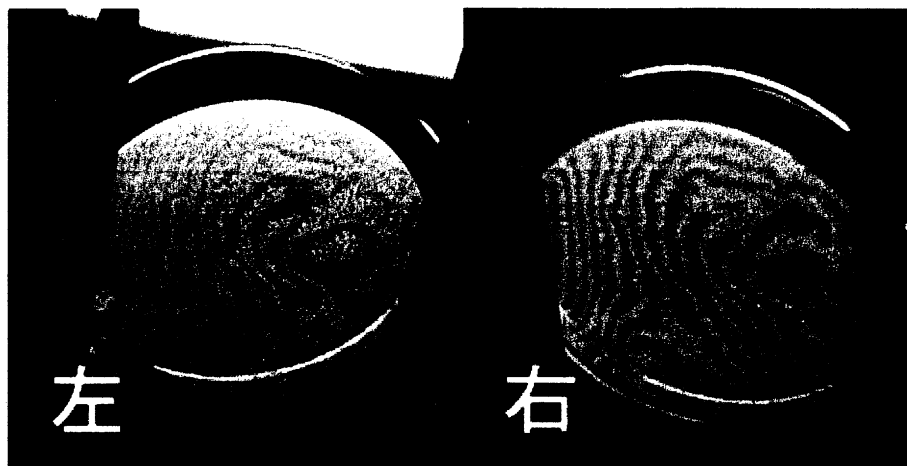
メラを元の位置に戻して撮影した③のパターンは①と一致している。この位置①、②、③の写真は、見る角度を変えると（光のあて方を変えると）パターンが変化し、見る角度を元に戻すと（光のあて方を元に戻すと）パターンが元に戻る事を示している。この一連の撮影過程は、マクロなパターンが変化する特徴的時間（60 秒～90 秒）と比べると遥かに短い数秒間に行ったため、ミクロな菌の運動によるパターンの変化ではなく、光学的な変化である。

（その2）図 8(b)のように、シャーレ上のパターンを、角度を変えて2箇所の位置から同時に撮影した。

その結果、図 9(b)のように、同時に撮影した左と右でパターンの明暗が反転している。図 9(a)同様に、光学的にパターンが変化することを示している。



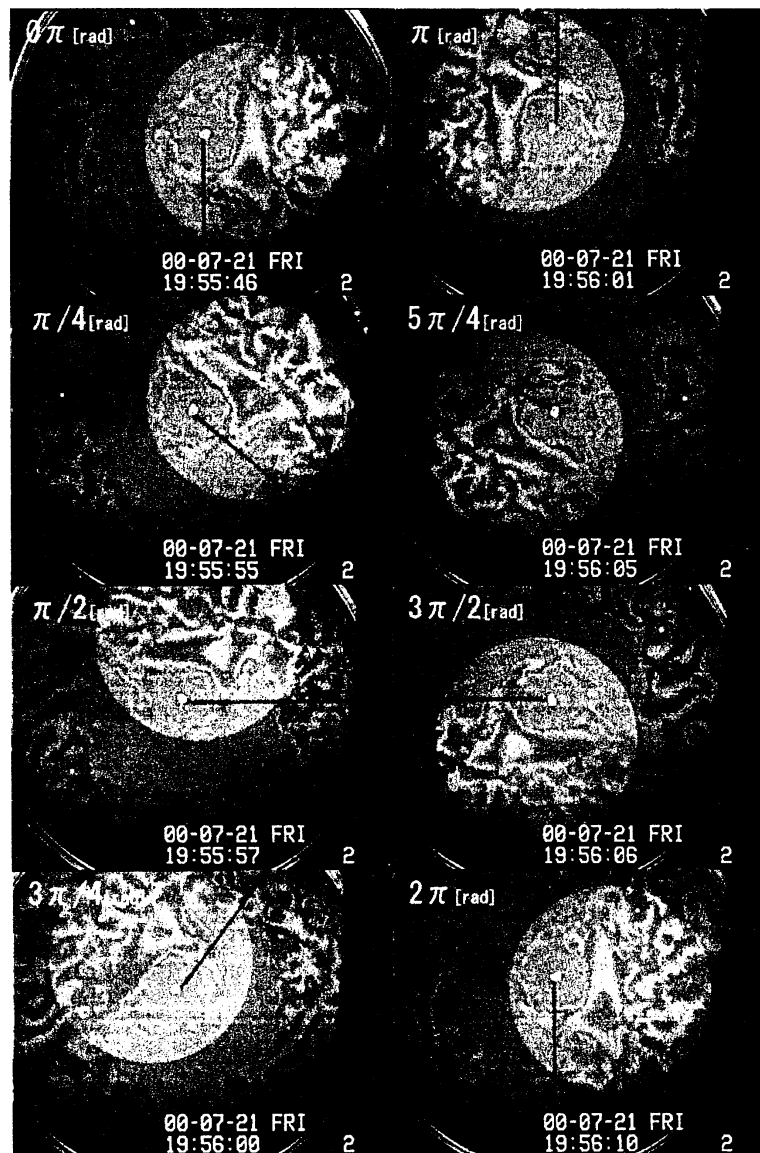
（図 9-a）左（①）で撮影した後、右（②）で撮影し再び左（③）で撮影。
①と②を比較するとパターンの明暗が反転しており、③は①と一致する。



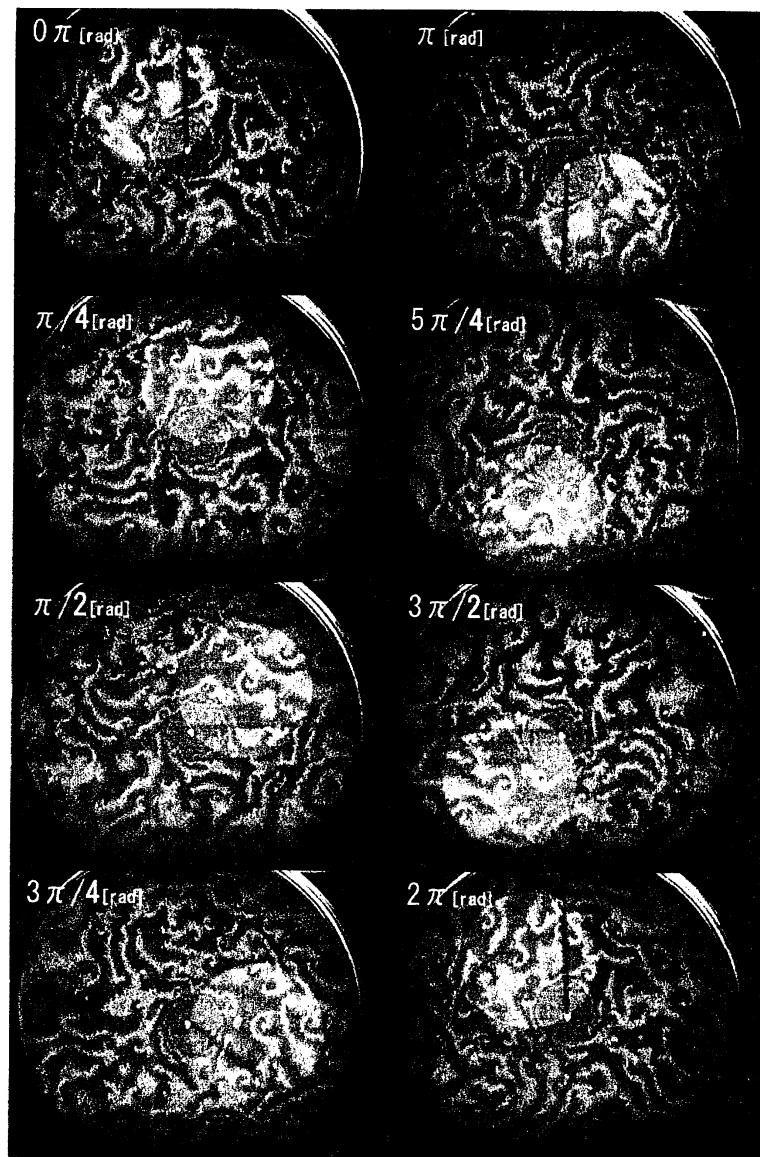
（図 9-b）パターンを2台のカメラで異なる角度（左、右）から同時に撮影。
左右の写真を比較すると、パターンの明暗が反転している。

（その3）図 8(c)のように、平行に並べた蛍光灯によってシャーレ上に現れているパターンを照らし、シャーレを $0\pi \sim 2\pi$ まで回転させることによって光のあて方を変化させる。この際、パターンが変化する様子をシャーレ上方から CCD カメラを用いて記録する。
その結果、図 9(c)、(d)のように、シャーレを $0\pi \sim 2\pi$ まで回転させると、不動点を中心に

湧き出したり、吸い込まれるターゲットや、回転しながら湧き出したり、吸い込まれるスパイラルが観察される。ターゲット、スパイラルのどちらのパターンの場合にも、 $\pi/4$ 回転で湧き出しが起こり始め、 $\pi/2$ 回転でパターンの明暗が反転し、 π 回転で元に戻り、再び湧き出しが起きた後に 2π 回転（元の 0π の位置）すると元（ 0π ）のパターンに戻る。タイムラプスビデオを用いてパターンを撮影すると、時間変化するパターンの中にターゲットや回転するスパイラルなどが観測されるが、これは菌の運動によってミクロな構造が時間的に変化する事によって見られる現象である。一方、図 9(c)、(d)は菌が静止していても、光のあて方を変える事によっても湧き出し、吸い込みのあるターゲットや回転するスパイラルが観察される事を表している。すなわち、時空パターンは、光のあて方を変える事（見る角度を変える事）によって重ね合わせ構造が変化し、モアレ像が敏感に変化するというモアレ像の特徴を満たしていることを表している。



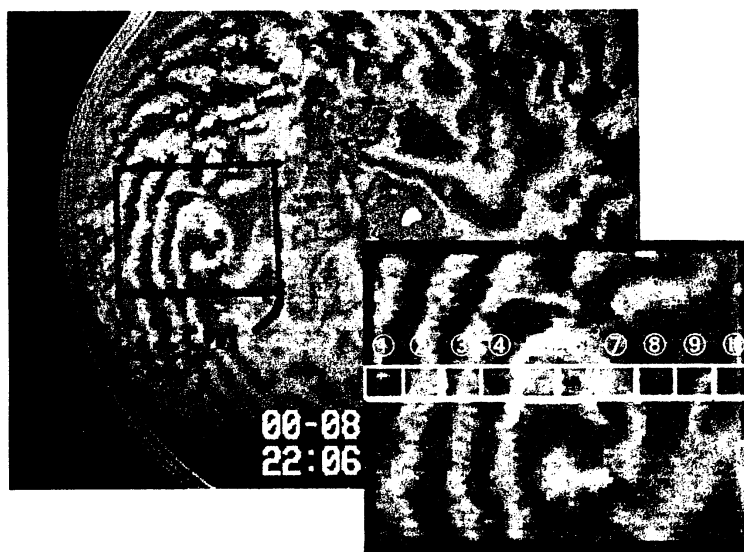
(図 9-c) シャーレを 0π から 2π まで回転させ、光のあて方を変える事によって得られる、湧き出すターゲット。6 時の位置から反時計回りに回転させた。 0π から回転させると湧き出しが起こり、 $\pi/2$ で明暗が反転、 π で元に戻る。 $5\pi/4$ で再び湧き出しが起こり、 2π (0π と同じ位置) で元に戻る。ターゲットの中心は不動点となっている。時計回りに回転させると、吸い込みになる。



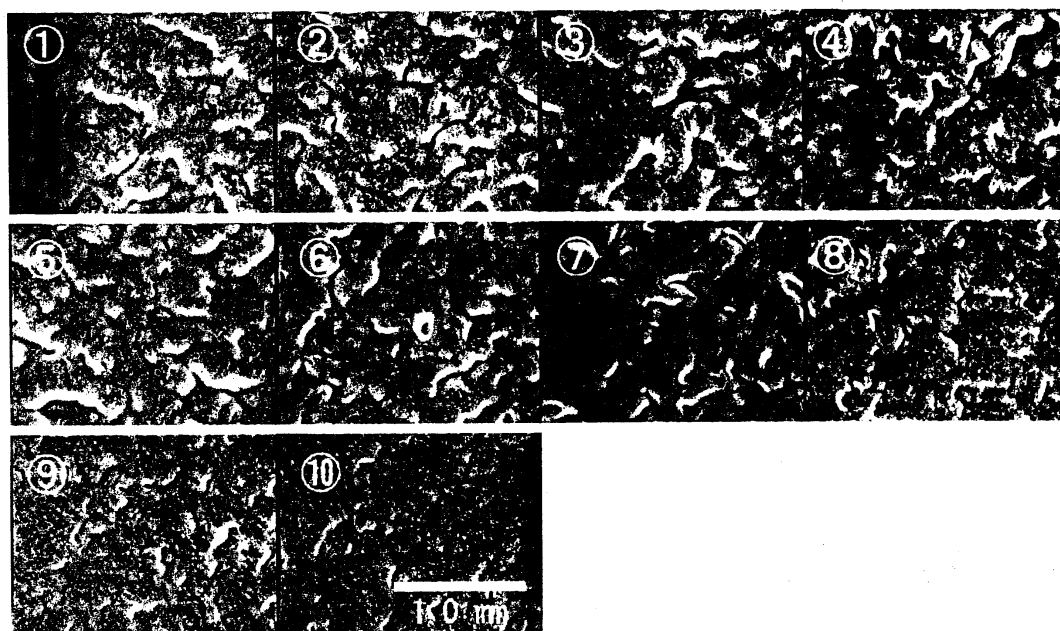
(図 9-d) シャーレを 0π から 2π まで回転させ、光のあて方を変える事によって得られる、湧き出すスパイラル。12 時の位置から時計回りに回転させた。 0π からシャーレを回転させると湧き出しが起こり、 $\pi/2$ で明暗が反転、 π で元に戻る。 $5\pi/4$ で再び湧き出しが起こり、 2π (0π と同じ位置) でパターンは元に戻る。スパイラルの中心は不動点となっている。反時計回りに回転させると、吸い込みになる。

3. 3. パターンの明暗部分の顕微鏡観察

パターンに見られる明暗は、3.2. で述べたように、光のあて方を変えると敏感に変化し、反転したり、元に戻ったりする。この明暗部分が直接、菌密度の違いの反映でない事を確認するために、明暗部分のミクロ構造を顕微鏡観察した。ミクロ構造を観察する際、マクロな明暗部分のどこを見ているのかをはっきりさせるため、以下のような方法で観察した。図 10(a) のように、ちょうどストライプが現れている領域を横切るようにして対物レンズの倍率 4 倍で顕微鏡観察を行った。倍率 $\times 4$ で観察を行った結果、マクロに見られるストライプの明暗に対応するような菌密度の高低は観察されなかった。明暗どちらの領域にもくっ付いたり離れたたりしながら移動するニョロニョロと動く構造が一面に観察される。



(図 10-a) パターン中のストライプの明暗を横切るように顕微鏡観察を行った。図中の柵の横幅は 2 mm。左から順に①、②...⑩。



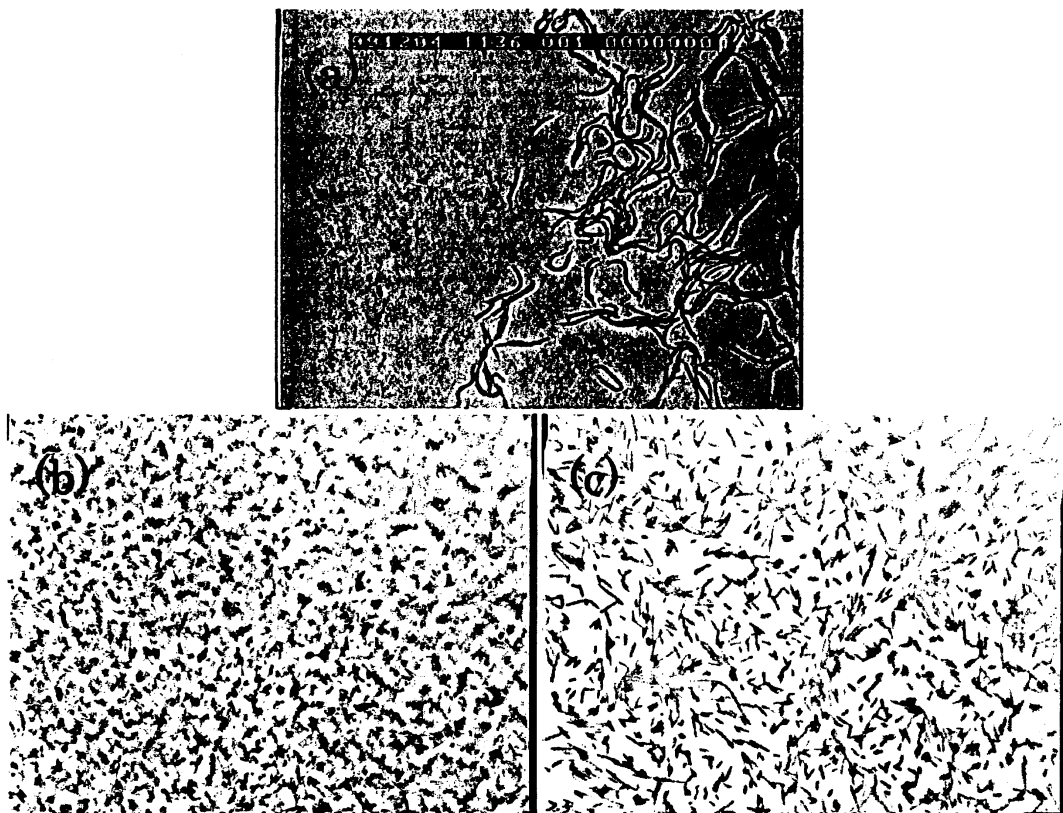
(図 10-b) 図 10-a のストライプの顕微鏡観察結果 (対物レンズの倍率×4)。①～⑩までマクロな明暗に対応するような菌密度の高低は見られず、一様であると考えられる。くっ付いたり離れたりしながら移動するニョロニョロ構造が一面に存在する。①～⑩の各スナップショットの横幅は 2 mm。

§ 4. Experimental Results of Microscopic Features

時空パターンがモアレ像として理解できる為には、ミクロに観察をしていくと、層構造があることが必要である。この層構造の存在を確認するために顕微鏡を用いてミクロな観察を行った。そこで、時空パターンが起きている際に特徴的な菌の形態、菌の運動性、さらにその結果現れるミクロな構造を知るために、時空パターンが起きる前、起きた後、終了後のそれぞれについて顕微鏡観察を行い、ミクロ構造の比較を行った。

4.1. 時空パターンが起きる前のマイクロ構造

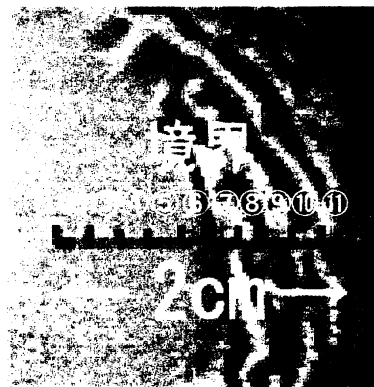
パターンが起きる前の観察は、コロニーがディスク状に拡大をしている時とシャーレ全体に拡大した後について観察した。コロニーがディスク状に拡大をしている時、その成長先端の図 11(a)のように **swarmer cell** が筏を組んで移動しているが、層構造は見られず単層である。また、シャーレ全体にコロニーが広がりきった後は図 11(b)、(c)のように **swimmer cell** が多く存在し、多少 **swarmer cell** が混ざっている。**swarmer cell**、**swimmer cell** のどちらも活発に運動することなく、静止しているか、ランダムに運動している程度である。そして層構造は見られず、単層である事がわかる。また、(b)、(c)は同時刻に撮影した写真であるが、(b)はシャーレ全体に広がりきった後の中心部、(c)は中心から 2.5cm の位置である。同時刻にも関わらず、(b)、(c)では菌密度に違いがあるが、これは図 5-②のように中心部分のほうが中心から 2.5cm の位置よりも早く時空パターンが現れる事と対応していると考えられる。



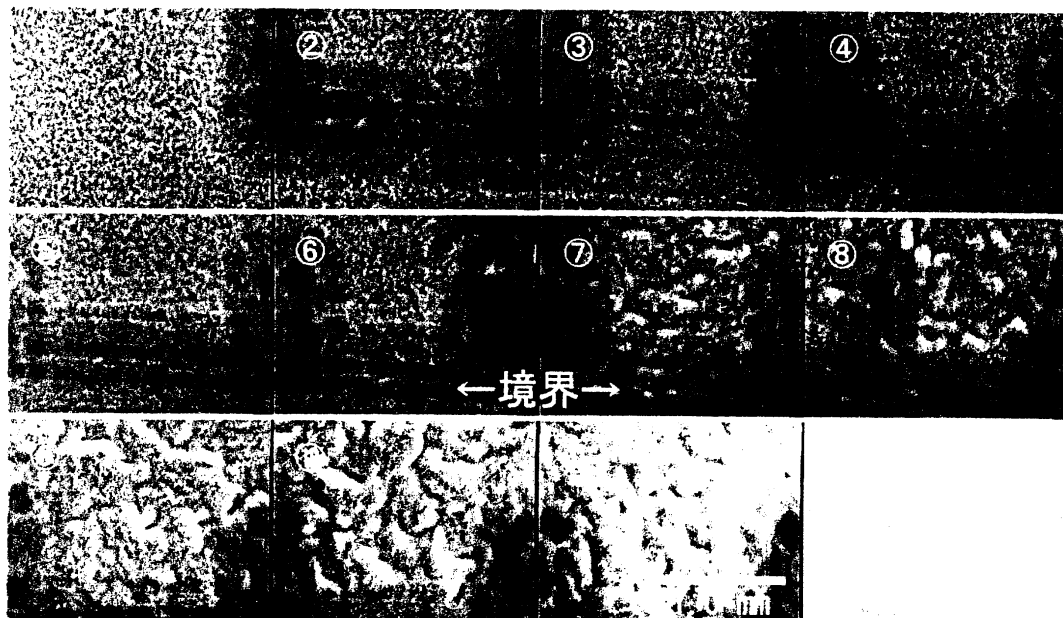
(図 11) 時空パターンの起きる前の顕微鏡観察結果 (対物レンズの倍率 $\times 40$)。 (a)シャーレ上をディスク状に拡大している時の成長先端。**swarmer cell** が筏を組んで図の左側に向かって進んでいる。 (b)シャーレ全体に広がりきった後の中心部。**swimmer cell** が大部分を占める。図(c)に比べて菌密度が高い。 (c)シャーレ全体に広がりきった後の中心から 2.5 cm の位置。図(b)に比べて菌密度が低い、いずれ(b)のように菌密度が上がる。各写真の横幅は 0.2 mm。

4.2. 時空パターンの起きている領域のマイクロ構造

図 12(a)のように、時空パターンの現れている領域と現れていない領域の境界を対物レンズの倍率 $\times 4$ で顕微鏡観察した。その結果 (図 12-b)、時空パターン現れている領域ではくっ付いたり離れたりしながら移動するニョロニョロ構造が見られるのに対して、現れていない領域に向かっていくに従ってこのニョロニョロ構造が見られなくなることが観察された。従って、このニョロニョロ構造が一面に存在している事が時空パターンに特徴的な構造であると考えられる。

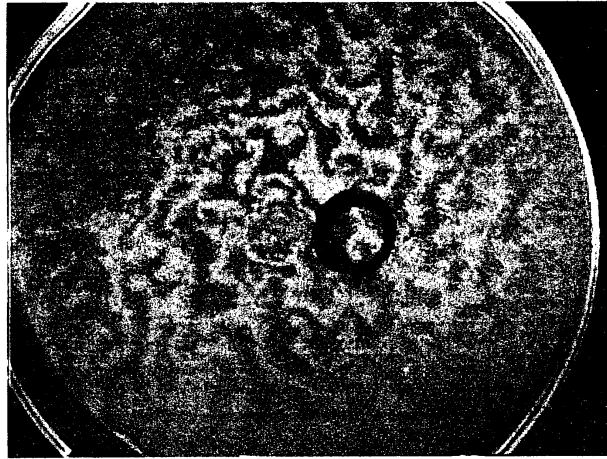


(図 12-a) 時空パターンが現れている領域と現れていない領域の境界付近を顕微鏡観察（対物レンズの倍率 $\times 4$ ）。2 mm 刻みの目盛り毎に観察。左端から順に①、②...⑪。

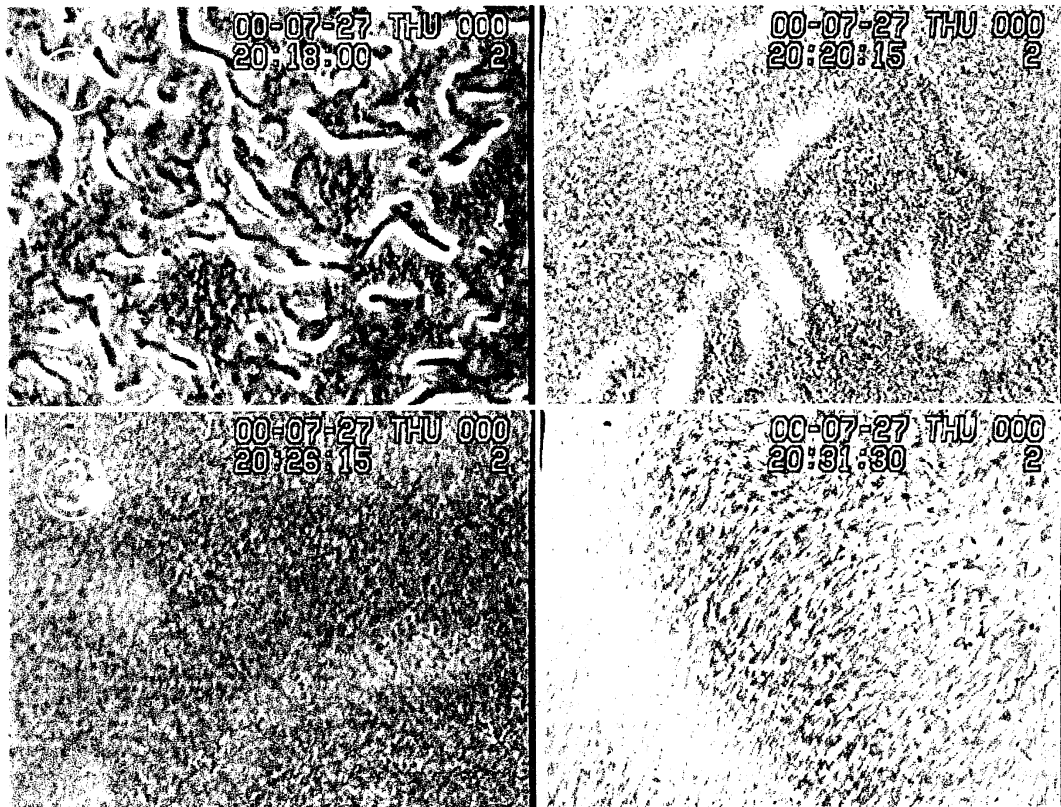


(図 12-b) 境界部分の顕微鏡観察結果（対物レンズの倍率 $\times 4$ ）。時空パターンにはニョロニョロ構造が見られる。一方、現れていない領域に行くに従ってニョロニョロ構造はなくなっていく。

時空パターンに特徴的なニョロニョロ構造（対物レンズの倍率 $\times 4$ 倍で観察した時）をより倍率を上げて観察した。図 13-a の○印の領域を固定して倍率 $\times 10$ 、 $\times 20$ 、 $\times 40$ で観察をすると、swarmer cell が集団となって一方向に高速で流れていく様子が観察される。そして、異なった方向に流れる swarmer cell の集団が衝突し、交錯した場所では集団の流れは低速になり、澱みを生じる。この澱みの部分がニョロニョロ構造に相当する。また、swarmer cell の高速一方向流はニョロニョロ構造に垂直であることが図 13-b-②③④から観察される。swarmer cell 一匹が判別できる倍率 $\times 40$ で観察すると、ニョロニョロ構造の部分では菌が折り重なって層構造をなしている。また、ニョロニョロ構造の周辺部分では、swarmer cell が集団となって一方向に高速で運動する場合や、逆方向に流れる集団同士が互いの間をすり抜けるようにして、あるいは上下に重なりながら運動する場合が観察される。これらは、モアレ像が生じるために必要な層構造に相当すると考えられる。



(図 13-a) 時空パターンが起きている時のマクロパターン。図中の○印の領域を固定して顕微鏡観察。

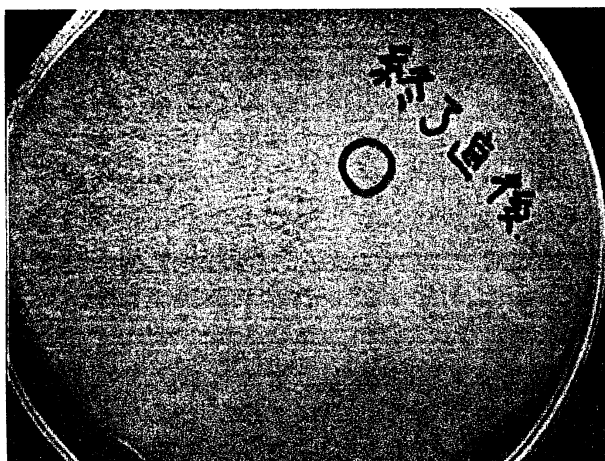


(図 13-b) 時空パターンが起きている時の顕微鏡観察結果。対物レンズの倍率と各写真の横幅は、それぞれ①:×4, 2 mm ②:×10, 0.8 mm ③:×20, 0.4 mm ④:×40, 0.2 mm。①:くっ付いたり離れたりしながら移動するニョロニョロ構造が一面に存在する。①に見られるニョロニョロ構造の明暗は②,③,④の明暗に対応する。また、高速で運動する swarmer cell の集団は、ニョロニョロ構造に対して垂直に流れている。④:swarmer cell の流れが衝突したところに swarmer cell の層構造が見られる。

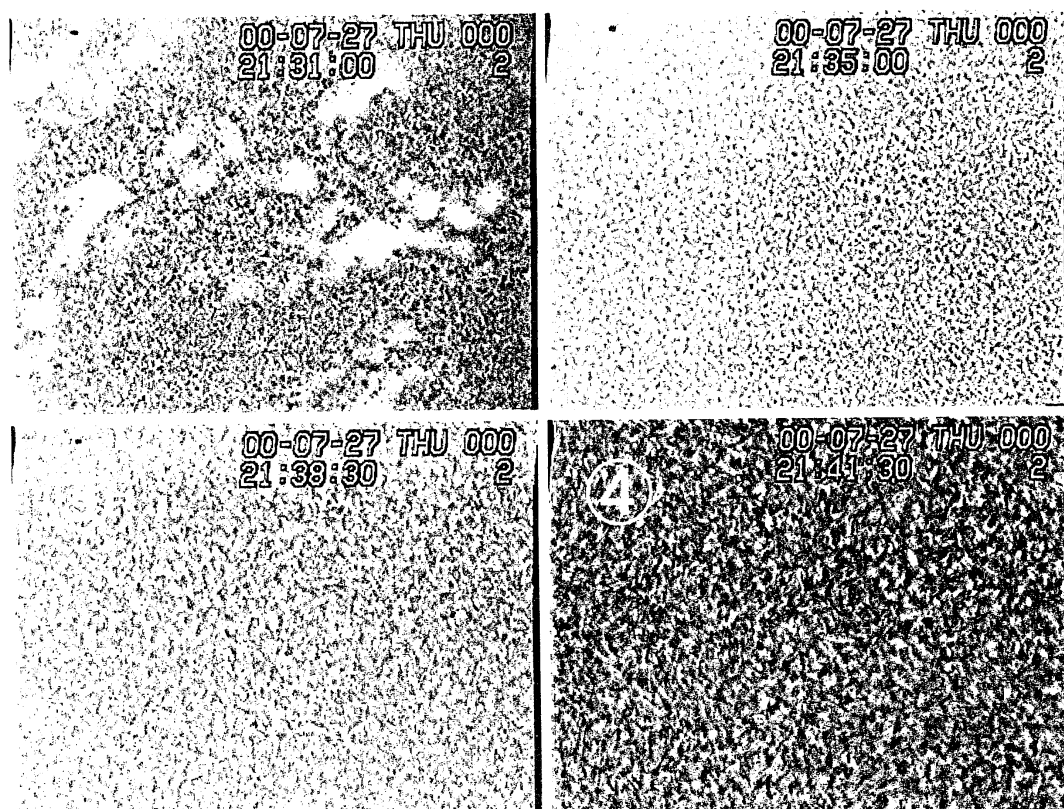
4.3. 時空パターンの終了直後のミクロ構造

時空パターンが終了した直後には、時空パターンが現れている時のような、大きさが～mm のストライプ、欠陥のあるストライプ、ターゲット、スパイラルなどのパターンはマクロに見られなくなり、細かい格子状のパターンが見られる。そこで、時空パターンが終了した直後に図 14-a の○印の領域を固定して顕微鏡観察を行った。対物レンズの倍率×4 で観察した

結果、パターン終了直後は、パターンが現れていた時（図 13-b-①）のようなくっ付いたり離れたりするニョロニョロ構造は減少、あるいは見られなくなっていく。また、倍率を $\times 10$ 、 $\times 20$ 、 $\times 40$ と上げていくと、時空パターンが起きている時のような swarmer cell の集団による方向性をもった高速流は見られず、菌は一様に分布している。また、倍率 $\times 40$ で観察すると、swarmer cell がお互いに絡み合い、層を成してはいるが、ほとんど運動していない様子が観察される。



（図 14-a）時空パターン終了直後のマクロパターン。図中○印の領域を固定して顕微鏡観察。



（図 14-b）時空パターン終了直後の顕微鏡観察結果。対物レンズの倍率と各写真の横幅は、それぞれ ①： $\times 4$ 、2 mm ②： $\times 10$ 、0.8 mm ③： $\times 20$ 、0.4 mm ④： $\times 40$ 、0.2 mm。①：図 13-b-①と比較して、時空パターンに特徴的なニョロニョロ構造が減少している。②③④：図 13-b-②③④と比較して、特徴的な構造がなく、一様に菌が折り重り、層をなしているが、swarmer cell の集団運動は見られない。

§ 5. Discussion

我々は、同心円状リングコロニーを形成することで有名な *P. mirabilis* が、ある程度栄養が豊富で寒天濃度が低い環境下で形成する時空パターンの形成機構及びその実体解明を行ってきた。このパターンは、*P. mirabilis* の morphological diagram の他の領域に見られるパターンと比較して、Pr、Ph、Q、R 領域に見られるパターンがコロニーの最終的な姿で、菌密度の高低によって形成されているのに対して、コロニーがディスク状に拡大してシャーレ全体に広がりきった後 3 時間程度の間だけ見られる過渡的なパターンで、マクロに見る限り、菌密度の高低によって形成されているようには見えず、とても薄いパターンである。また、肉眼で観察する限りパターン変化は容易には確認されず、タイムラプスビデオを用いて撮影した映像を早回しにして見ないとパターンの変化が確認できない準静的なパターンである。しかし、このタイムラプスビデオによって記録された映像を見ると、時空パターンにはストライプ、切り替えのあるストライプ、湧き出し、吸い込みのあるターゲット、回転するスパイラルなどの特徴的なパターンを含んでいることが確認される。時空パターンに見られる明暗が菌密度の高低の反映によるものなのか？また、顕微鏡で観察する限り、ミクロには一見、無秩序に集団運動している $\sim \mu\text{m}$ のオーダーのバクテリアがどうしてマクロに $\sim \text{mm}$ のオーダーのストライプ、ターゲット、スパイラルなどのパターンを作るのか？このような疑問のもと、このパターンの形成機構及び実体解明を行うにあたり、我々はその形成機構及び実体がモアレ像ではないかという仮説に基づいてマクロ、ミクロの両面から検証実験を行った。マクロには、①時空パターンに見られるパターンがモアレ効果によって再現できるのか？②時空パターンは光学的パターンなのかどうか？③モアレ像の特徴である重ね合わせ構造の変化に対する感性が見られるか？④パターンに見られる明暗は菌密度の高低の反映なのか？という事柄について検証を行い、ミクロにはモアレ像が生じるのに必要な層構造が存在するのかという事について検証を行った。

まず、マクロな検証結果について考察する。3.1.のように、時空パターンに見られるストライプ、切り替えのあるストライプ、ターゲット、スパイラルなどの特徴的なパターンは、モアレ効果を用いたモデルによっても再現する事が出来、モアレ像にも見られることが確認された。また、モアレ像の特徴である重ね合わせ構造の変化に対する感性については、実際にシャーレ上のパターンを見る角度を変えたり、光をあてる角度を変えれば瞬時にパターンが変化することから明らかであるが、3.2.で述べた 3 つの証拠によっても確認された。また、パターンの明暗が菌の密度の反映であるのか？という疑問に対し、3.3.で行った明暗部分の顕微鏡観察によって、明暗に対応するような菌密度の分布は観察されず、明暗部分は一樣であることがわかった。従って、マクロには、時空パターンは光学的パターンであり、光のあて方を変えたり、見る角度を変えたりすることによって敏感にパターンが変化するという結果は、モアレ像の重ね合わせ構造の変化に対する感性に対応する。ところで、時空パターンが偏光によって起きている可能性についても検証を行った。方法は、パターンの現れているシャーレを 2 枚の偏光フィルターではさみ、全く光が透過しないように（時空パターンが見えない様に）セットする。時間がたつと、菌の運動によってミクロ構造が変わるため、もし swarmer cell の集団がスリットの役割を果たし、バクテリアコロニーによって偏光が起きているのであれば、新たに偏光された光が透過してくると思えられる。しかし、この実験の結果、時間が経過しても光が透過してくることはなく、偏光ではないことが確認された。

次に、ミクロな検証結果について考察する。顕微鏡を用いたミクロ構造の観察では、時空パターンが現れている時に層構造に相当する構造が存在するかが問題であった。4.1.、4.2.、4.3.における結果から、時空パターンに特徴的な構造は、対物レンズの倍率 4 倍では、くっ付いたり離れたりしながら移動するニョロニョロ構造が一面に分布している構造である。このニョロニョロ構造を、倍率を上げて $\times 10$ 、 $\times 20$ 、 $\times 40$ で観察すると、互いに反対方向に向かって高速で運動する swarmer cell の集団同士が衝突して澱んでいる部分に相当することがわ

かる。この澱んだ部分では、swarmer cell が折り重なるように層構造をなしている。また、ニョロニョロ構造の周辺部分に見られる高速で運動する swarmer cell の集団は、一方向に高速で運動する場合や、逆方向に流れる集団同士が互いの間をすり抜けるようにして、あるいは上下に重なりながら運動する場合が観察される。これらは、モアレ像に必要な層構造に相当すると考えられる。

以上、マクロとミクロの両面から検証を行った結果、時空パターンをモアレ像として理解するという仮説を支持する結果が得られたのではないかと考えられる。

ところで、時空パターンをモアレ像として理解する上で、今後、検証しなければならない事柄がある。まず、3.1.で行ったモアレ効果を用いたモデルとの比較では、欠陥のあるストライプ、ターゲット、スパイラルを再現する際に特異点が必要であった。実際に時空パターン中に見られるパターンは不動点を中心に湧き出し、吸い込み、切り替え等が起きるが、その不動点部分にあるはずの特異点に相当する構造が swarmer cell の集団運動中のどの部分と対応しているのかが未だ理解できていない。また、特徴的なパターンの大きさは $\sim \text{mm}$ 、 $\sim \text{cm}$ のオーダーなので、 $\sim \text{mm}$ 、 $\sim \text{cm}$ の幅を持つパターンの中に含まれる多数のニョロニョロ構造全体の振るまいとパターンの対応について調べることは、時空パターンをモアレ像として理解するために必要である。一方、ミクロな swarmer cell の集団運動の結果、時空パターンが起きることは理解できたが、swarmer cell の集団運動が起きるきっかけ、及び集団運動が終了するきっかけは未だ理解できていない。さらに、時空パターンが時空カオスである可能性についても検証する必要があると考えられる。

References

- [1] M. Ohgiwari, M. Matsushita and T. Matsuyama: "Morphological Change in Growth Phenomena of Bacterial Patterns" J. Phys. Soc. Jpn. **61** (1992) 816.
- [2] 松下貢、松山東平：細菌集団によるパターン形成 岩波 科学 vol.64 No.2 (1994).
- [3] O. Rauprich, M. Matsushita, C. J. Weijer, F. Siegert, S. E. Esipov and J. A. Shapiro: "Periodic Phenomena in *Proteus mirabilis* Swarm Colony Development" J. Bacteriol. **178** (1996) 6525-6538.
- [4] H. Itoh, J. Wakita, T. Matsuyama and M. Matsushita: "Periodic Pattern Formation of Bacteria Colonies" J. Phys. Soc. Jpn. **68** (1999) 1436-1443.
- [5] T. Matsuyama, Y. Takagi, Y. Nakagawa, H. Itoh, J. Wakita and M. Matsushita: "Dynamic Aspects of the Structured Cell Population in a Swarming Colony of *Proteus mirabilis*" J. Bacteriol. **182**. (2000) 385-393.
- [6] H. Itoh, J. Wakita, K. Watanabe, T. Matsuyama and M. Matsushita: "Periodic Colony Formation of Bacteria Due to their Cell Reproduction and Movement" Prog. Theor. Phys. Suppl. **139** (2000).
- [7] A. Nakahara, Y. Shimada, J. Wakita, M. Matsushita and T. Matsuyama: "Morphological Diversity of the Colony Produced by Bacteria *Proteus mirabilis*" J. Phys. Soc. Jpn. **65** (1996) 2700-2706.
- [8] Y. Shimada, A. Nakahara, M. Matsushita and T. Matsuyama: "Spatiotemporal Patterns Produced by Bacteria" J. Phys. Soc. Jpn. **64** (1995) 1896-1899.
- [9] S. Nasuno, M. Sano and Y. Sawada: "Phase Wave Propagation in the Rectangular Convective Structure of Nematic Liquid Crystal" J. Phys. Soc. Jpn. **58** (1989) 1875.
- [10] J. Boissonade, E. Dulos and P. De Kepper: "Turing Patterns: From Myth to Reality", in *Chemical Waves and Patterns*, eds. R. Kapral and K. Showalter (Kluwer, Dordrecht, 1995) pp.221-268.
- [11] 甲斐昌一：液晶におけるパターン形成 日本物理学会誌 Vol.51, No.9, 1996.
- [12] Isaac Amidor: "The Theory of the Moiré Phenomenon".
- [13] O. Moriyam and M. Matsushita: "Simple Model for Target Patterns and Spiral Waves" J. Phys. Soc. Jpn. **64** (1995) 1081.